

Attorney Docket :  
32301 WD 218

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

PATENT

10/9/97 U.S. PTO  
09/960738



Applicant(s): Brigitte BATHE, et al.

Group Art Unit : Unassigned

Serial No. : Unassigned

Examiner : Unassigned

Filed: September 24, 2001

For: NUCLEOTIDE SEQUENCES WHICH CODE FOR THE ppgK GENE

CLAIM FOR FOREIGN PRIORITY

Commissioner for Patents  
Washington, DC 20231

Sir:

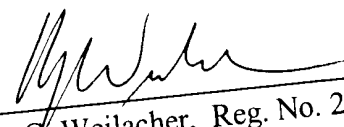
Under 35 U.S.C. §119, Applicants claim the benefit of the filing date of Patent Application **100 47 403.9** filed in **Germany** on **September 26, 2000**.

In support of this claim, a certified copy of the German priority application is attached hereto.

Respectfully submitted,

SMITH, GAMBRELL & RUSSELL, LLP

By :

  
Robert G. Weilacher, Reg. No. 20,531  
1850 M Street, NW - Suite 800  
Washington, DC 20036  
Telephone: (202) 659-2811  
Facsimile: (202) 263-4329

Date : September 24, 2001



## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 100 47 403.9

**Anmeldetag:** 26. September 2000

**Anmelder/Inhaber:** Degussa AG, Düsseldorf/DE

**Erstanmelder:** Degussa-Hüls Aktiengesellschaft,  
Frankfurt am Main/DE

**Bezeichnung:** Neue für das ppgK-Gen kodierende  
Nukleotidsequenzen

**IPC:** C 12 N, C 12 Q, C 07 H

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 26. Juli 2001  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

## Neue für das ppgK-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

Gegenstand der Erfindung sind für das ppgK-Gen kodierende Nukleotidsequenzen aus coryneformen Bakterien und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren  
5 unter Verwendung von Bakterien, in denen das ppgK-Gen verstärkt wird.

### Stand der Technik

L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, in der  
10 Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der Tierernährung, Anwendung.

Es ist bekannt, daß Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere Corynebacterium glutamicum, hergestellt werden. Wegen der  
15 großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen wie zum Beispiel Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien wie zum Beispiel die  
20 Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform durch zum Beispiel Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

25 Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite oder auxotroph für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und  
30 Aminosäuren produzieren.

Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung von

L-Aminosäure produzierenden Stämmen von Corynebacterium eingesetzt, indem man einzelne Aminosäure-Biosynthesegene amplifiziert und die Auswirkung auf die Aminosäure-Produktion untersucht.

5 Aufgabe der Erfindung

Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von Aminosäuren bereitzustellen.

Beschreibung der Erfindung

- 10 Werden im folgenden L-Aminosäuren oder Aminosäuren erwähnt, sind damit eine oder mehrere Aminosäuren einschließlich ihrer Salze, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan und L-Arginin gemeint. Besonders bevorzugt ist L-Lysin.

Wenn im folgenden L-Lysin oder Lysin erwähnt werden, sind damit nicht nur die Basen, sondern auch die Salze wie z.B. Lysin-Monohydrochlorid oder Lysin-Sulfat gemeint.

- 20 Gegenstand der Erfindung ist ein isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine für das ppgK-Gen kodierende Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- 25 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von
- 30 SEQ ID No. 2,

- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
- d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),

wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität der Polyphosphat-Glukokinase aufweist.

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls das oben genannte Polynukleotid, wobei es sich bevorzugt um eine replizierbare DNA handelt, enthaltend:

- (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1, oder
- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Kodes entspricht, oder
- (iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert, und gegebenenfalls
- (iv) funktionsneutralen Sinnmutationen in (i).

Weitere Gegenstände sind

ein replizierbares Polynukleotid, insbesondere DNA, enthaltend die Nukleotidsequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt;

ein Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID No. 2 dargestellt, enthält;

ein Vektor, enthaltend das erfindungsgemäße Polynukleotid, insbesondere Pendelvektor oder Plasmidvektor, und

coryneforme Bakterien, die den Vektor enthalten oder in denen das ppgK-Gen verstärkt ist.

Gegenstand der Erfindung sind ebenso Polynukleotide, die im wesentlichen aus einer Polynukleotidsequenz bestehen, die  
5 erhältlich sind durch Screening mittels Hybridisierung einer entsprechenden Genbank eines coryneformen Bakteriums, die das vollständige Gen oder Teile davon enthält, mit einer Sonde, die die Sequenz des erfindungsgemäßen Polynukleotids gemäß SEQ ID No.1 oder ein Fragment davon  
10 enthält und Isolierung der genannten Polynukleotidsequenz.

Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung enthalten, sind als Hybridisierungs-Sonden für RNA, cDNA und DNA geeignet, um Nukleinsäuren beziehungsweise Polynukleotide oder Gene in voller Länge zu isolieren, die  
15 für die Polyphosphat-Glukokinase kodieren, oder um solche Nukleinsäuren beziehungsweise Polynukleotide oder Gene zu isolieren, die eine hohe Ähnlichkeit der Sequenz mit der des ppgK-Gens aufweisen.

Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung  
20 enthalten, sind weiterhin als Primer geeignet, mit deren Hilfe mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) DNA von Genen hergestellt werden kann, die für die Polyphosphat-Glukokinase kodieren.

Solche als Sonden oder Primer dienende Oligonukleotide,  
25 enthalten mindestens 30, bevorzugt mindestens 20, ganz besonders bevorzugt mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide. Geeignet sind ebenfalls Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 40 oder 50 Nukleotiden.

„Isoliert“ bedeutet aus seinem natürlichen Umfeld  
30 herausgetrennt.

„Polynukleotid“ bezieht sich im allgemeinen auf Polyribonukleotide und Polydeoxyribonukleotide, wobei es

sich um nicht modifizierte RNA oder DNA oder modifizierte RNA oder DNA handeln kann.

Die Polynukleotide gemäß Erfindung schließen ein Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder ein daraus  
5 hergestelltes Fragment und auch solche ein, die zu wenigstens 70%, bevorzugt zu wenigstens 80% und besonders zu wenigstens 90% bis 95% identisch sind mit dem Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder eines daraus hergestellten Fragments.

10 Unter „Polypeptiden“ versteht man Peptide oder Proteine, die zwei oder mehr über Peptidbindungen verbundene Aminosäuren enthalten.

Die Polypeptide gemäß Erfindung schließen ein Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2, insbesondere solche mit der  
15 biologischen Aktivität der Polyphosphat-Glukokinase und auch solche ein, die zu wenigstens 70%, bevorzugt zu wenigstens 80% und besonders zu wenigstens 90% bis 95% identisch sind mit dem Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2 und die genannte Aktivität aufweisen.

20 Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-  
25 Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan und L-Arginin, unter Verwendung von coryneformen Bakterien, die insbesondere bereits Aminosäuren produzieren und in denen die für das ppgK-Gen kodierenden Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

30 Der Begriff „Verstärkung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise

die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöht, einen starken Promotor verwendet oder ein Gen verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

- 5 Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können L-Aminosäuren aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es kann sich um Vertreter coryneformer Bakterien insbesondere der Gattung *Corynebacterium* handeln. Bei der Gattung *Corynebacterium* ist insbesondere die Art *Corynebacterium glutamicum* zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist, L-Aminosäuren zu produzieren.

- 10 Geeignete Stämme der Gattung *Corynebacterium*, insbesondere der Art *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*), sind besonders die bekannten Wildtypstämme

- Corynebacterium glutamicum* ATCC13032  
*Corynebacterium acetoglutamicum* ATCC15806  
*Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC13870  
20 *Corynebacterium thermoaminogenes* FERM BP-1539  
*Corynebacterium melassecola* ATCC17965  
*Brevibacterium flavum* ATCC14067  
*Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869 und  
*Brevibacterium divaricatum* ATCC14020

- 25 und daraus hergestellte L-Aminosäuren produzierende Mutanten bzw. Stämme.

Das neue, für das Enzym Polyphosphat-Glukokinase (EC 2.7.1.63) kodierende ppgK-Gen von *C. glutamicum* wurde isoliert.

- 30 Zur Isolierung des ppgK-Gens oder auch anderer Gene von *C. glutamicum* wird zunächst eine Genbank dieses Mikroorganismus in *Escherichia coli* (*E. coli*) angelegt. Das Anlegen von Genbanken ist in allgemein bekannten



- Lehrbüchern und Handbüchern niedergeschrieben. Als Beispiel seien das Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland, 1990), oder das Handbuch von Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) genannt. Eine sehr bekannte Genbank ist die des E. coli K-12 Stammes W3110, die von Kohara et al. (Cell 50, 495-508 (1987)) in  $\lambda$ -Vektoren angelegt wurde. Bathe et al. (Molecular and General Genetics, 252:255-265, 1996) beschreiben eine Genbank von C. glutamicum ATCC13032, die mit Hilfe des Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al., 1987, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 84:2160-2164) im E. coli K-12 Stamm NM554 (Raleigh et al., 1988, Nucleic Acids Research 16:1563-1575) angelegt wurde.
- 15 Börmann et al. (Molecular Microbiology 6(3), 317-326 (1992)) wiederum beschreiben eine Genbank von C. glutamicum ATCC13032 unter Verwendung des Cosmids pH79 (Hohn und Collins, Gene 11, 291-298 (1980)).
- Zur Herstellung einer Genbank von C. glutamicum in E. coli können auch Plasmide wie pBR322 (Bolivar, Life Sciences, 25, 807-818 (1979)) oder pUC9 (Vieira et al., 1982, Gene, 19:259-268) verwendet werden. Als Wirte eignen sich besonders solche E. coli Stämme, die restriktions- und rekombinationsdefekt sind. Ein Beispiel hierfür ist der Stamm DH5 $\alpha$ mc<sup>r</sup>, der von Grant et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 87 (1990) 4645-4649) beschrieben wurde. Die mit Hilfe von Cosmiden klonierten langen DNA-Fragmente können anschließend wiederum in gängige, für die Sequenzierung geeignete Vektoren subkloniert und anschließend sequenziert werden, so wie es z.B. bei Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74:5463-5467, 1977) beschrieben ist.
- Die erhaltenen DNA-Sequenzen können dann mit bekannten Algorithmen bzw. Sequenzanalyse-Programmen wie z.B. dem von

Staden (Nucleic Acids Research 14, 217-232 (1986)), dem von Marck (Nucleic Acids Research 16, 1829-1836 (1988)) oder dem GCG-Programm von Butler (Methods of Biochemical Analysis 39, 74-97 (1998)) untersucht werden.

5 Die neue für das Gen ppgK kodierende DNA-Sequenz von C. glutamicum wurde gefunden, die als SEQ ID No. 1 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. Weiterhin wurde aus der vorliegenden DNA-Sequenz mit den oben beschriebenen Methoden die Aminosäuresequenz des entsprechenden Proteins  
10 abgeleitet. In SEQ ID No. 2 ist die sich ergebende Aminosäuresequenz des ppgK-Genproduktes dargestellt.

Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID No. 1 durch die Degeneriertheit des genetischen Kodes ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In gleicher Weise sind  
15 DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren, Bestandteil der Erfindung. In der Fachwelt sind weiterhin konservative Aminosäureaustausche wie z.B. Austausch von Glycin gegen Alanin oder von Asparaginsäure gegen Glutaminsäure in Proteinen als  
20 „Sinnmutationen“ („sense mutations“) bekannt, die zu keiner grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins führen, d.h. funktionsneutral sind. Weiterhin ist bekannt, daß Änderungen am N- und/oder C-Terminus eines Proteins dessen Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen oder sogar  
25 stabilisieren können. Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Ben-Bassat et al. (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (Gene 77:237-251 (1989)), bei Sahin-Toth et al. (Protein Sciences 3:240-247 (1994)), bei Hochuli et al. (Bio/Technology  
30 6:1321-1325 (1988)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie. Aminosäuresequenzen, die sich in entsprechender Weise aus SEQ ID No. 2 ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung.

In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1  
35 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren Bestandteil der

Erfindung. Schließlich sind DNA-Sequenzen Bestandteil der Erfindung, die durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung von Primern hergestellt werden, die sich aus SEQ ID No. 1 ergeben. Derartige Oligonukleotide haben  
5 typischerweise eine Länge von mindestens 15 Nukleotiden.

Anleitungen zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mittels Hybridisierung findet der Fachmann unter anderem im Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH  
10 (Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology (1991) 41: 255-260). Die Hybridisierung findet unter stringenten Bedingungen statt, das heisst, es werden nur Hybride gebildet, bei denen Sonde und Zielsequenz, d. h. die mit  
15 der Sonde behandelten Polynukleotide, mindestens 70% identisch sind. Es ist bekannt, dass die Stringenz der Hybridisierung einschließlich der Waschschriffe durch Variieren der Pufferzusammensetzung, der Temperatur und der Salzkonzentration beeinflusst bzw. bestimmt wird. Die  
20 Hybridisierungsreaktion wird vorzugsweise bei relativ niedriger Stringenz im Vergleich zu den Waschschriffen durchgeführt (Hybaid Hybridisation Guide, Hybaid Limited, Teddington, UK, 1996).

Für die Hybridisierungsreaktion kann beispielsweise ein 5x  
25 SSC-Puffer bei einer Temperatur von ca. 50°C - 68°C eingesetzt werden. Dabei können Sonden auch mit Polynukleotiden hybridisieren, die weniger als 70% Identität zur Sequenz der Sonde aufweisen. Solche Hybride sind weniger stabil und werden durch Waschen unter  
30 stringenten Bedingungen entfernt. Dies kann beispielsweise durch Senken der Salzkonzentration auf 2x SSC und gegebenenfalls nachfolgend 0,5x SSC (The DIG System User's Guide for Filter Hybridisation, Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland, 1995) erreicht werden, wobei eine  
35 Temperatur von ca. 50°C - 68°C eingestellt wird. Es ist

gegebenenfalls möglich die Salzkonzentration bis auf 0,1x SSC zu senken. Durch schrittweise Erhöhung der Hybridisierungstemperatur in Schritten von ca. 1 - 2°C von 50°C auf 68°C können Polynukleotidfragmente isoliert werden, die beispielsweise mindestens 70% oder mindestens 80% oder mindestens 90% bis 95% Identität zur Sequenz der eingesetzten Sonde besitzen. Weitere Anleitungen zur Hybridisierung sind in Form sogenannter Kits am Markt erhältlich (z.B. DIG Easy Hyb von der Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Catalog No. 1603558).

Anleitungen zur Amplifikation von DNA-Sequenzen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) findet der Fachmann unter anderem im Handbuch von Gait: Oligonukleotide synthesis: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994).

Es wurde gefunden, daß coryneforme Bakterien nach Überexpression des ppgK-Gens in verbesserter Weise Aminosäuren produzieren.

Zur Erzielung einer Überexpression kann die Kopienzahl der entsprechenden Gene erhöht werden, oder es kann die Promotor- und Regulationsregion oder die Ribosomenbindungsstelle, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet, mutiert werden. In gleicher Weise wirken Expressionskassetten, die stromaufwärts des Strukturgens eingebaut werden. Durch induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich, die Expression im Verlaufe der fermentativen Aminosäure-Produktion zu steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer der m-RNA wird ebenfalls die Expression verbessert. Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt. Die Gene oder Genkonstrukte können entweder in Plasmiden mit

unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im Chromosom integriert und amplifiziert sein. Alternativ kann weiterhin eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden.

Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Martin et al. (Bio/Technology 5, 137-146 (1987)), bei Guerrero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya und Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), bei Eikmanns et al. (Gene 102, 93-98 (1991)), in der Europäischen Patentschrift 0 472 869, im US Patent 4,601,893, bei Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)), bei Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)), bei LaBarre et al. (Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), in der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Malumbres et al. (Gene 134, 15 - 24 (1993)), in der japanischen Offenlegungsschrift JP-A-10-229891, bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195 (1998)), bei Makrides (Microbiological Reviews 60:512-538 (1996)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.

Zur Verstärkung wurde das erfindungsgemäße ppgK-Gen beispielhaft mit Hilfe von episomalen Plasmiden überexprimiert. Als Plasmide eignen sich solche, die in coryneformen Bakterien repliziert werden. Zahlreiche bekannte Plasmidvektoren wie z.B. pZ1 (Menkel et al., Applied and Environmental Microbiology (1989) 64: 549-554), pEKEx1 (Eikmanns et al., Gene 102:93-98 (1991)) oder pHS2-1 (Sonnen et al., Gene 107:69-74 (1991)) beruhen auf den kryptischen Plasmiden pHM1519, pBL1 oder pGA1. Andere Plasmidvektoren wie z.B. solche, die auf pCG4 (US-A 4,489,160), oder pNG2 (Serwold-Davis et al., FEMS Microbiology Letters 66, 119-124 (1990)), oder pAG1 (US-A 5,158,891) beruhen, können in gleicher Weise verwendet werden.

Weiterhin eignen sich auch solche Plasmidvektoren mit Hilfe derer man das Verfahren der Genamplifikation durch Integration in das Chromosom anwenden kann, so wie es beispielsweise von Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)) zur Duplikation bzw. Amplifikation des hom-thrB-Operons beschrieben wurde. Bei dieser Methode wird das vollständige Gen in einen Plasmidvektor kloniert, der in einem Wirt (typischerweise E. coli), nicht aber in C. glutamicum replizieren kann. Als Vektoren kommen beispielsweise pSUP301 (Simon et al., Bio/Technology 1, 784-791 (1983)), pK18mob oder pK19mob (Schäfer et al., Gene 145, 69-73 (1994)), pGEM-T (Promega corporation, Madison, WI, USA), pCR2.1-TOPO (Shuman (1994). Journal of Biological Chemistry 269:32678-84; US-A 5,487,993), pCR®Blunt (Firma Invitrogen, Groningen, Niederlande; Bernard et al., Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)), pEM1 (Schrumpf et al, 1991, Journal of Bacteriology 173:4510-4516) oder pBGS8 (Spratt et al., 1986, Gene 41: 337-342) in Frage. Der Plasmidvektor, der das zu amplifizierende Gen enthält, wird anschließend durch Konjugation oder Transformation in den gewünschten Stamm von C. glutamicum überführt. Die Methode der Konjugation ist beispielsweise bei Schäfer et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 756-759 (1994)) beschrieben. Methoden zur Transformation sind beispielsweise bei Thierbach et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), Dunican und Shivnan (Bio/Technology 7, 1067-1070 (1989)) und Tauch et al. (FEMS Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)) beschrieben. Nach homologer Rekombination mittels eines "cross over"-Ereignisses enthält der resultierende Stamm mindestens zwei Kopien des betreffenden Gens.

Zusätzlich kann es für die Produktion von L-Aminosäuren vorteilhaft sein, neben dem ppgK-Gen eines oder mehrere Enzyme des jeweiligen Biosyntheseweges, der Glykolyse, der Anaplerotik, des Zitronensäure-Zyklus, des Pentosephosphat-

Zyklus, des Aminosäure-Exports und gegebenenfalls regulatorische Proteine zu verstärken, insbesondere überzuexprimieren.

5 So kann für die Herstellung von L-Aminosäuren zusätzlich zur Verstärkung des ppgK-Gens eines oder mehrere Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Dihydrodipicolinat-Synthase kodierende Gen dapA (EP-B 0 197 335),
- 10 • das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase kodierende Gen gap (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die Triosephosphat-Isomerase kodierende Gen tpi (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- 15 • das für die 3-Phosphoglycerat-Kinase kodierende Gen pgk (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase kodierende Gen zwf (JP-A-09224661),
- das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende Gen pyc (DE-A-198 31 609),
- 20 • das für die Malat-Chinon-Oxidoreduktase kodierende Gen mgo (Molenaar et al., European Journal of Biochemistry 254, 395-403 (1998)),
- das für eine feed-back resistente Aspartatkinase kodierende Gen lysC (Accession No.P26512),
- 25 • das für den Lysin-Export kodierende Gen lysE (DE-A-195 48 222),
- das für die Homoserin-Dehydrogenase kodierende Gen hom (EP-A 0131171),

- das für die Threonin-Dehydratase kodierende Gen *ilvA* (Möckel et al., Journal of Bacteriology (1992) 8065-8072)) oder das für eine "feed back resistente" Threonin-Dehydratase kodierende Allel *ilvA(Fbr)* (Möckel et al.,  
5 (1994) Molecular Microbiology 13: 833-842),

- das für die Acetohydroxysäure-Synthase kodierenden Gen *ilvBN* (EP-B 0356739),

- das für die Dihydroxysäuredehydratase kodierende Gen *ilvD* (Sahm und Eggeling (1999) Applied and Environmental  
10 Microbiology 65: 1973-1979),

- das für das Zwa1-Protein kodierende Gen *zwa1* (DE: 19959328.0, DSM 13115),

verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

15 Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren vorteilhaft sein, zusätzlich zur Verstärkung des *ppgK*-Gens eines oder mehrere Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen *pck* (DE 199 50 409.1; DSM 13047),

- das für die Glucose-6-Phosphat-Isomerase kodierende Gen  
20 *pgi* (US 09/396,478; DSM 12969),

- das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen *poxB* (DE: 1995 1975.7; DSM 13114),

- das für das Zwa2-Protein kodierende Gen *zwa2* (DE: 19959327.2, DSM 13113)

25 abzuschwächen, insbesondere die Expression zu verringern.

Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren vorteilhaft sein, neben der Überexpression des *ppgK*-Gens



unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Micro-organisms", in: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

- 5 Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung und können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch - Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren)
- 10 zum Zwecke der Produktion von Aminosäuren kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden ist im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozeßtechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch
- 15 von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

- Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im
- 20 Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten.

- Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose,
- 25 Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z.B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z.B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z.B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z.B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe
- 30 können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff-haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat,

Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die  
5 entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wuchsstoffe  
10 wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise  
15 während der Kultivierung zugefüttert werden.

Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur  
20 Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe wie z.B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen  
25 aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoff haltige Gasmischungen wie z.B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum des  
30 gewünschten Produktes gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Methoden zur Bestimmung von L-Aminosäuren sind aus dem Stand der Technik bekannt. Die Analyse kann zum Beispiel so  
35 wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958),

1190) beschrieben durch Ionenaustausch-Chromatographie mit anschließender Ninhydrin-Derivatisierung erfolgen, oder sie kann durch reversed phase HPLC erfolgen, so wie bei Lindroth et al. (Analytical Chemistry (1979) 51: 1167-1174) beschrieben.

Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren.

Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

10 Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Escherichia coli sowie alle Techniken zur Restriktion, Klenow- und alkalische Phosphatasebehandlung wurden nach Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA) durchgeführt. Methoden zur Transformation von Escherichia coli sind ebenfalls in diesem Handbuch beschrieben.

Die Zusammensetzung gängiger Nährmedien wie LB- oder TY-Medium kann ebenfalls dem Handbuch von Sambrook et al. entnommen werden.

## 20 Beispiel 1

Herstellung einer genomischen Cosmid-Genbank aus Corynebacterium glutamicum ATCC 13032

Chromosomale DNA aus Corynebacterium glutamicum ATCC 13032 wurde wie bei Tauch et al. (1995, Plasmid 33:168-179) beschrieben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Code no. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Code no. 1758250) dephosphoryliert. Die DNA des Cosmid-Vektors SuperCos1 (Wahl et al. (1987) Proceedings of the National Academy of

Sciences USA 84:2160-2164), bezogen von der Firma  
Stratagene (La Jolla, USA, Produktbeschreibung SuperCos1  
Cosmid Vektor Kit, Code no. 251301) wurde mit dem  
Restriktionsenzym XbaI (Amersham Pharmacia, Freiburg,  
5 Deutschland, Produktbeschreibung XbaI, Code no. 27-0948-02)  
gespalten und ebenfalls mit shrimp alkalischer Phosphatase  
dephosphoryliert.

Anschließend wurde die Cosmid-DNA mit dem Restriktionsenzym  
BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland,  
10 Produktbeschreibung BamHI, Code no. 27-0868-04) gespalten.  
Die auf diese Weise behandelte Cosmid-DNA wurde mit der  
behandelten ATCC13032-DNA gemischt und der Ansatz mit T4-  
DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland,  
Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no. 27-0870-04)  
15 behandelt. Das Ligationsgemisch wurde anschließend mit  
Hilfe des Gigapack II XL Packing Extracts (Stratagene, La  
Jolla, USA, Produktbeschreibung Gigapack II XL Packing  
Extract, Code no. 200217) in Phagen verpackt.

Zur Infektion des E. coli Stammes NM554 (Raleigh et al.  
20 1988, Nucleic Acid Research 16:1563-1575) wurden die Zellen  
in 10 mM MgSO<sub>4</sub> aufgenommen und mit einem Aliquot der  
Phagensuspension vermischt. Infektion und Titerung der  
Cosmidbank wurden wie bei Sambrook et al. (1989, Molecular  
Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor)  
25 beschrieben durchgeführt, wobei die Zellen auf LB-Agar  
(Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 100 mg/l Ampicillin  
ausplattiert wurden. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C  
wurden rekombinante Einzelklone selektioniert.

### Beispiel 2

30 Isolierung und Sequenzierung des ppgK-Gens

Die Cosmid-DNA einer Einzelkolonie wurde mit dem Qiaprep  
Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden,  
Germany) nach Herstellerangaben isoliert und mit dem

Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Product No. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgte die Isolierung der Cosmidfragmente im Größenbereich von 1500 bis 2000 bp mit dem QiaExII Gel Extraction Kit (Product No. 20021, Qiagen, Hilden, Germany).

Die DNA des Sequenziervektors pZero-1, bezogen von der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande, Produktbeschreibung Zero Background Cloning Kit, Product No. K2500-01), wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Product No. 27-0868-04) gespalten. Die Ligation der Cosmidfragmente in den Sequenziervektor pZero-1 wurde wie von Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei das DNA-Gemisch mit T4-Ligase (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) über Nacht inkubiert wurde. Dieses Ligationsgemisch wurde anschließend in den E. coli Stamm DH5 $\alpha$ MCR (Grant, 1990, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 87:4645-4649) elektroporiert (Tauch et al. 1994, FEMS Microbiol Letters, 123:343-7) und auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 50 mg/l Zeocin ausplattiert.

Die Plasmidpräparation der rekombinanten Klone erfolgte mit dem Biorobot 9600 (Product No. 900200, Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Sequenzierung erfolgte nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 74:5463-5467) mit Modifikationen nach Zimmermann et al. (1990, Nucleic Acids Research, 18:1067). Es wurde der "RR dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Kit" von PE Applied Biosystems

(Product No. 403044, Weiterstadt, Deutschland) verwendet.  
Die gelelektrophoretische Auftrennung und Analyse der  
Sequenzierreaktion erfolgte in einem "Rotiphorese NF  
Acrylamid/Bisacrylamid" Gel (29:1) (Product No. A124.1,  
5 Roth, Karlsruhe, Germany) mit dem "ABI Prism 377"  
Sequenziergerät von PE Applied Biosystems (Weiterstadt,  
Deutschland).

Die erhaltenen Roh-Sequenzdaten wurden anschließend unter  
Anwendung des Staden-Programmpakets (1986, Nucleic Acids  
10 Research, 14:217-231) Version 97-0 prozessiert. Die  
Einzelsequenzen der pZerol-Derivate wurden zu einem  
zusammenhängenden Contig assembliert. Die computergestützte  
Kodierbereichsanalyse wurde mit dem Programm XNIP (Staden,  
1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) angefertigt.

15 Die erhaltene Nukleotidsequenz ist in SEQ ID No. 1  
dargestellt. Die Analyse der Nukleotidsequenz ergab ein  
offenes Leseraster von 789 Basenpaaren, welches als ppgK-  
Gen bezeichnet wurde. Das ppgK-Gen kodiert für ein Protein  
von 262 Aminosäuren.

## SEQUENZPROTOKOLL

&lt;110&gt; Degussa-Hüls AG

5 &lt;120&gt; Neue für das ppgK-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

&lt;130&gt; 000569 BT

&lt;140&gt;

10 &lt;141&gt;

&lt;160&gt; 2

15 &lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1239

&lt;212&gt; DNA

20 &lt;213&gt; Corynebacterium glutamicum

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (237)..(1022)

25 &lt;223&gt; ppgK-Gen

&lt;400&gt; 1

ggccgaagtt cctgcaacct attggcgata aaatcttcag ccaaagtatc tactatcgtc 60  
 accggatcga ctgtcgaaact tttggtgttg gtgtagtccc acaaattggt gagttcagca 120  
 cgcttatccc tgatacgtag agcggtaagc gtggcagttt ccgcggcgat ggcacgcaac 180  
 tcattaaacg attgttggtc cataagacca tcatcgttgt ttttttagaa aattgc ctg 239  
 Met  
 1

cca aaa gcc gaa gta att tgt aca ctt ggg cgc atg act gag act gga 287  
 Pro Lys Ala Glu Val Ile Cys Thr Leu Gly Arg Met Thr Glu Thr Gly  
 5 10 15

40 ttt gga att gat atc ggt ggc tcc ggc atc aaa ggc gcc cgc gtt aac 335  
 Phe Gly Ile Asp Ile Gly Gly Ser Gly Ile Lys Gly Ala Arg Val Asn  
 20 25 30

45 ctt aag acc ggt gag ttt att gat gaa cgc ata aaa atc gcc acc cct 383  
 Leu Lys Thr Gly Glu Phe Ile Asp Glu Arg Ile Lys Ile Ala Thr Pro  
 35 40 45

50 aag cca gca acc cca gag gct gtc gcc gaa gta gtc gca gag att att 431  
 Lys Pro Ala Thr Pro Glu Ala Val Ala Glu Val Val Ala Glu Ile Ile  
 50 55 60 65

55 tct caa gcc gaa tgg gag ggt ccg gtc gga att acc ctg ccg tcg gtc 479  
 Ser Gln Ala Glu Trp Glu Gly Pro Val Gly Ile Thr Leu Pro Ser Val  
 70 75 80

gtt cgc ggg cag atc gcg cta tcc gca gcc aac att gac aag tcc tgg 527  
 Val Arg Gly Gln Ile Ala Leu Ser Ala Ala Asn Ile Asp Lys Ser Trp  
 85 90 95

atc ggc acc gat gtg cac gaa ctt ttt gac cgc cac cta aat ggc cga 575  
 Ile Gly Thr Asp Val His Glu Leu Phe Asp Arg His Leu Asn Gly Arg  
 100 105 110  
 5 gag atc acc gtt ctc aat gac gca gac gcc gcc ggc atc gcc gaa gca 623  
 Glu Ile Thr Val Leu Asn Asp Ala Asp Ala Ala Gly Ile Ala Glu Ala  
 115 120 125  
 10 acc ttt ggc aac cct gcc gca cgc gaa ggc gca gtc atc ctg ctg acc 671  
 Thr Phe Gly Asn Pro Ala Ala Arg Glu Gly Ala Val Ile Leu Leu Thr  
 130 135 140 145  
 15 ctt ggt aca ggt att gga tcc gca ttc ctt gtg gat ggc caa ctg ttc 719  
 Leu Gly Thr Gly Ile Gly Ser Ala Phe Leu Val Asp Gly Gln Leu Phe  
 150 155 160  
 20 ccc aac aca gaa ctc ggt cac atg atc gtt gac gcc gag gaa gca gaa 767  
 Pro Asn Thr Glu Leu Gly His Met Ile Val Asp Gly Glu Glu Ala Glu  
 165 170 175  
 25 cac ctt gca gca gca tcc gtc aaa gaa aac gaa gat ctg tca tgg aag 815  
 His Leu Ala Ala Ala Ser Val Lys Glu Asn Glu Asp Leu Ser Trp Lys  
 180 185 190  
 30 aaa tgg gcg aag cac ctg aac aag gtg ctg agc gaa tac gag aaa ctt 863  
 Lys Trp Ala Lys His Leu Asn Lys Val Leu Ser Glu Tyr Glu Lys Leu  
 195 200 205  
 35 ttc tcc cca tcc gtc ttc atc atc ggt ggc gga att tcc aga aag cac 911  
 Phe Ser Pro Ser Val Phe Ile Ile Gly Gly Gly Ile Ser Arg Lys His  
 210 215 220 225  
 40 gaa aag tgg ctt cca ttg atg gag cta gac act gac att gtc cca gct 959  
 Glu Lys Trp Leu Pro Leu Met Glu Leu Asp Thr Asp Ile Val Pro Ala  
 230 235 240  
 gag ctg cgc aat cga gcc gga atc gta gga gct gcc atg gca gta aac 1007  
 Glu Leu Arg Asn Arg Ala Gly Ile Val Gly Ala Ala Met Ala Val Asn  
 245 250 255  
 45 caa cac ctc acc cca taagttatcg aaaggtgatt ttgcccagg gccttgattc 1062  
 Gln His Leu Thr Pro  
 260  
 acaacgcacc ttgctgtagg aaaaacaggc ccctttgtga catcggcgta gttgttcaac 1122  
 tataatggaa cgctgatcgt ggacaagagt taaccatgag attgattcac ccctttaagc 1182  
 50 ctccaaagaa gtagttgact caacgcattt cggcatttaa aaaagccgag agcaaat 1239  
 <210> 2  
 <211> 262  
 55 <212> PRT  
 <213> Corynebacterium glutamicum  
 <400> 2



Met Pro Lys Ala Glu Val Ile Cys Thr Leu Gly Arg Met Thr Glu Thr  
 1 5 10 15  
 5 Gly Phe Gly Ile Asp Ile Gly Gly Ser Gly Ile Lys Gly Ala Arg Val  
 20 25 30  
 Asn Leu Lys Thr Gly Glu Phe Ile Asp Glu Arg Ile Lys Ile Ala Thr  
 35 40 45  
 10 Pro Lys Pro Ala Thr Pro Glu Ala Val Ala Glu Val Val Ala Glu Ile  
 50 55 60  
 15 Ile Ser Gln Ala Glu Trp Glu Gly Pro Val Gly Ile Thr Leu Pro Ser  
 65 70 75 80  
 Val Val Arg Gly Gln Ile Ala Leu Ser Ala Ala Asn Ile Asp Lys Ser  
 85 90 95  
 20 Trp Ile Gly Thr Asp Val His Glu Leu Phe Asp Arg His Leu Asn Gly  
 100 105 110  
 Arg Glu Ile Thr Val Leu Asn Asp Ala Asp Ala Ala Gly Ile Ala Glu  
 115 120 125  
 25 Ala Thr Phe Gly Asn Pro Ala Ala Arg Glu Gly Ala Val Ile Leu Leu  
 130 135 140  
 30 Thr Leu Gly Thr Gly Ile Gly Ser Ala Phe Leu Val Asp Gly Gln Leu  
 145 150 155 160  
 Phe Pro Asn Thr Glu Leu Gly His Met Ile Val Asp Gly Glu Glu Ala  
 165 170 175  
 35 Glu His Leu Ala Ala Ala Ser Val Lys Glu Asn Glu Asp Leu Ser Trp  
 180 185 190  
 Lys Lys Trp Ala Lys His Leu Asn Lys Val Leu Ser Glu Tyr Glu Lys  
 195 200 205  
 40 Leu Phe Ser Pro Ser Val Phe Ile Ile Gly Gly Gly Ile Ser Arg Lys  
 210 215 220  
 45 His Glu Lys Trp Leu Pro Leu Met Glu Leu Asp Thr Asp Ile Val Pro  
 225 230 235 240  
 Ala Glu Leu Arg Asn Arg Ala Gly Ile Val Gly Ala Ala Met Ala Val  
 245 250 255  
 50 Asn Gln His Leu Thr Pro  
 260

## Patentansprüche

1. Isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien,  
enthaltend eine für das ppgK-Gen kodierende  
5 Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe
  - a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist  
mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid  
kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2  
enthält,
  - 10 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das  
eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70%  
identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID  
No. 2,
  - c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den  
15 Polynukleotiden von a) oder b), und
  - d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15  
aufeinanderfolgende Nukleotide der  
Polynukleotidsequenz von a), b) oder c)
- wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität der  
20 Polyphosphat-Glukokinase aufweist.
2. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid  
eine in coryneformen Bakterien replizierbare, bevorzugt  
rekombinante DNA ist.
3. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid  
25 eine RNA ist.
4. Polynukleotid gemäß Anspruch 2, enthaltend die  
Nukleinsäuresequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt.
5. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 2, enthaltend
  - (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1, oder

- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz  
(i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des  
genetischen Kodes entspricht, oder
- (iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz  
5 (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert,  
und gegebenenfalls
- (iv) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i).
6. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 5, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, daß die Hybridisierung  
10 unter einer Stringenz entsprechend höchstens 2x SSC  
durchgeführt wird.
7. Polynukleotidsequenz gemäß Anspruch 1, die für ein  
Polypeptid kodiert, das die in SEQ ID No. 2  
dargestellte Aminosäuresequenz enthält.
- 15 8. Coryneforme Bakterien, in denen das ppgK-Gen verstärkt,  
insbesondere überexprimiert wird.
9. Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-  
Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, daß man folgende Schritte  
20 durchführt:
- a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure  
produzierenden coryneformen Bakterien, in denen man  
zumindest das ppgK-Gen oder dafür kodierende  
Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere  
25 überexprimiert;
- b) Anreicherung der L-Aminosäure im Medium oder in den  
Zellen der Bakterien, und
- c) Isolieren der L-Aminosäure.
10. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h  
30 g e k e n n z e i c h n e t, daß man Bakterien

einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des Biosyntheseweges der gewünschten L-Aminosäure verstärkt.

- 5 11. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, daß man Bakterien  
einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest  
teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung der  
gewünschten L-Aminosäure verringern.
- 10 12. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, daß man einen mit einem  
Plasmidvektor transformierten Stamm einsetzt, und der  
Plasmidvektor die für das ppgK-Gen kodierende  
Nukleotidsequenz trägt.
- 15 13. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, daß man die Expression des  
(der) Polynukleotides (e), das (die) für das ppgK-Gen  
kodiert (kodieren) verstärkt, insbesondere  
überexprimiert.
- 20 14. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, daß man die katalytischen  
Eigenschaften des Polypeptids (Enzymprotein) erhöht, für  
das das Polynukleotid ppgK kodiert.
- 25 15. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, daß man zur Herstellung  
von L-Aminosäuren coryneforme Mikroorganismen  
fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder  
mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe
- 30 15.1 das für die Dihydrodipicolinat-Synthase  
kodierende Gen dapA,
- 15.2 das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat-  
Dehydrogenase kodierende Gen gap,

- 15.3 das für die Triosephosphat-Isomerase kodierende Gen tpi,
- 15.4 das für die 3-Phosphoglycerat-Kinase kodierende Gen pgk,
- 5 15.5 das für die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase kodierende Gen zwf,
- 15.6 das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende Gen pyC,
- 10 15.7 das für die Malat-Chinon-Oxidoreduktase kodierende Gen mqo,
- 15.8 das für eine feed-back resistente Aspartatkinase kodierende Gen lysC,
- 15.9 das für den Lysin-Export kodierende Gen lysE,
- 15 15.10 das für die Homoserin-Dehydrogenase kodierende Gen hom,
- 15.11 das für die Threonin-Dehydratase kodierende Gen ilvA oder das für eine feed back resistente Threonin-Dehydratase kodierende Allel ilvA(Fbr),
- 20 15.12 das für die Acetohydroxysäure-Synthase kodierende Gen ilvBN,
- 15.13 das für die Dihydroxysäuredehydratase kodierende Gen ilvD,
- 25 15.14 das für das Zwa1-Protein kodierende Gen zwa1
- verstärkt bzw. überexprimiert.

16. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, daß man zur Herstellung  
von L-Aminosäuren coryneforme Mikroorganismen

fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- 16.1 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen *pck*,
- 5 16.2 das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase kodierende Gen *pgi*,
- 16.3 das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen *poxB*
- 16.4 das für das Zwa2-Protein kodierende Gen *zwa2*  
abschwächt.
- 10 17. Coryneforme Bakterien, die einen Vektor enthalten, der ein Polynukleotid gemäß Anspruch 1 trägt.
- 15 18. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man Mikroorganismen der Art *Corynebacterium glutamicum* einsetzt.
- 20 19. Verfahren zum Auffinden von RNA, cDNA und DNA, um Nukleinsäuren, beziehungsweise Polynukleotide oder Gene zu isolieren, die für die Polyphosphat-Glukokinase kodieren oder eine hohe Ähnlichkeit mit der Sequenz des *ppgK*-Gens aufweisen, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man das Polynukleotid, enthaltend die Polynukleotidsequenzen gemäß den Ansprüchen 1, 2, 3 oder 4, als Hybridisierungssonden einsetzt.

### Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein isoliertes Polynukleotid, enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- 5 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70%  
10 identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
- d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15  
15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),

und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren unter Verwendung von coryneformen Bakterien, in denen zumindest das ppgK-Gen verstärkt vorliegt, und die  
20 Verwendung von Polynukleotiden, die die erfindungsgemäßen Sequenzen enthalten, als Hybridisierungssonden.